

JP7179391

Publication Title:

COMPOUND GS-1302

Abstract:

Abstract of JP7179391

PURPOSE:To obtain a new compound useful as an antibacterial agent.
CONSTITUTION:This compound is represented by the formula [(a-b) and (c-d are each single bond or double bond], having the following physicochemical characteristics: appearance: white powder; melting point: 129-131 deg.C; specific rotatory power: $[\alpha]_D^{25} = 77.1$ deg. (C=0.114, chloroform); molecular weight: 275; molecular formula: C₁₈H₂₆O₂; solubility: readily soluble in methanol, acetone, ethyl acetate and chloroform, and sparingly soluble in water; color reaction: positive to iodine and sulfuric acid, etc.; The compound is obtained by culturing *Penicillium* sp. G-1302 (FERM BP-4470) strain under aerobic conditions at 20-40 deg.C near a neutral state for 3-10 days. Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

This Patent PDF Generated by Patent Fetcher(TM), a service of Stroke of Color, Inc.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - <http://www.sughrue.com>

(51) Int.Cl. ⁴	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 C 57/26		9356-4H		
A 0 1 N 37/06				
37/10				
C 0 7 C 57/50		9356-4H		

審査請求 未請求 請求項の数 1 O L (全 5 頁)

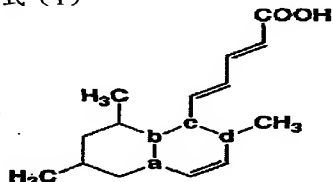
(21) 出願番号	特願平5-323918	(71) 出願人	000001029 協和醗酵工業株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号
(22) 出願日	平成5年(1993)12月22日	(72) 発明者	森下 芳和 東京都町田市本町田638-9
		(72) 発明者	安藤 勝彦 東京都町田市中町3-9-13
		(72) 発明者	我妻 勉 東京都町田市旭町3-6-6
		(72) 発明者	斎藤 裕 東京都町田市中町3-9-13
		(72) 発明者	松田 肇 東京都小金井市貫井南町1-22-7

(54) 【発明の名称】 化合物GS-1302類

(57) 【要約】

【目的】 優れた抗菌作用を有する新規生理活性物質を提供する。

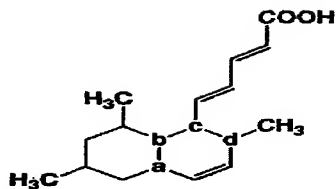
【構成】 式(I)



(I)

(式中、a-bおよびc-dは単結合または二重結合を表す)で表される化合物GS-1302類。

【特許請求の範囲】
【請求項1】 式(1)
【化1】



(I)

(式中、a-bおよびc-dは単結合または二重結合を表す)で表される化合物GS-1302類。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は抗菌作用を有し、抗菌剤として有用である化合物GS-1302類に関する。

【0002】

【従来の技術】抗菌作用を有する化合物はこれまでに数多く知られているが、GS-1302類と類似の構造を有する化合物は現在までに知られていない。

【0003】

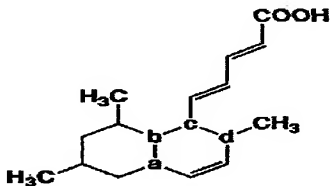
【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、優れた抗菌作用を有する新規生理活性物質を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明によれば、式(1)

【0005】

【化2】



(I)

【0006】(式中、a-bおよびc-dは単結合または二重結合を表す)で表される抗菌作用を有する化合物GS-1302類が提供される。該化合物はペニシリウム属に属する微生物を培養することによって得られる。以下に本発明を詳細に説明する。化合物GS-1302類において、式(Ia)

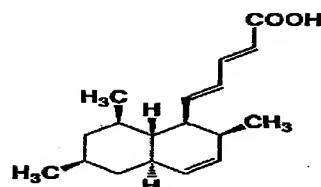
(2)

特開平7-179391

2

【0007】

【化3】

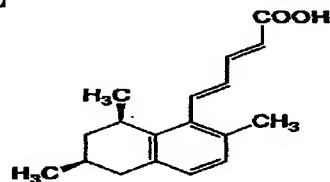


(Ia)

【0008】で表される化合物をGS-1302-1、または(Ib)

【0009】

【化4】



(Ib)

【0010】で表される化合物をGS-1302-3とそれぞれ命名する。GS-1302類の理化学的性質は、以下に示すとおりである。

【0011】(i) GS-1302-1

性状：白色粉末

融点：129~131℃

比旋光度：[α]_D²⁵=77.1°(c=0.114, クロロホルム)

分子量：275

分子式：C₁₈H₂₆O₂

【0012】高分解能質量分析(マトリックス：m-ニトロベンジルアルコール) m/z amu:実測値 275.2014

[M+H]⁺, 計算値(C₁₈H₂₇O₂として) 275.2011

赤外部吸収スペクトル(KBr法)：ν_{cm⁻¹}：3500, 3008, 1684, 1628, 1612, 1415, 1375, 1325.

紫外外部吸収スペクトル(メタノール中)：λ_{max}：265nm (log ε=4.48)

【0013】¹H-NMRスペクトル(400MHz、CDCl₃溶液)：δ ppm(積分、多重度、結合定数)：0.74(1H, d, 13.2, 13.2), 0.80(1H, dd, 12.7, 12.7), 0.88(3H, d, 6.3), 0.90(3H, d, 6.5), 0.92(1H, m), 0.94(3H, d, 7.1), 1.36(1H, m), 1.52(1H, m), 1.64(1H, ddd, 3.6, 5.6, 12.7), 1.80(1H, dd, 3.0, 3.1, 9.7, 9.7), 2.19(1H, m), 2.43(1H, ddd, 5.4, 10.

5, 10.5), 5.44(1H, ddd, 1.9, 1.9, 9.8), 5.56(1H, ddd, 3.0, 4.4, 9.8), 5.78(1H, d, 15.3), 6.12(1H, dd, 10.7, 15.2), 6.29(1H, dd, 10.5, 15.2), 7.38(dd, 10.7, 15.3).

【0014】¹³C-NMR スペクトル (100MHz, DMSO-d₆ 溶液): δ ppm (多重度): 16.52(q), 22.41(q), 22.79(q), 32.54(d), 36.59(q), 36.97(d), 41.79(t), 42.75(t), 46.75(t), 46.96(t), 49.41(t), 118.08(d), 126.36(d), 132.10(d), 132.30(d), 147.55(d), 151.98(d), 172.58(s).

【0015】溶解性: メタノール、アセトン、酢酸エチルおよびクロロホルムに易溶、水に難溶

呈色反応: ヨウ素、硫酸に陽性

薄層クロマトグラフィー: R_f 値 0.44

展開溶媒: クロロホルム-メタノール (20:1)

薄層: キーゼルゲル60F₂₅₄ (メルク社、Art. 5628)

展開方法: 室温、上昇法、15~60分

検出: 253.7nmの紫外線照射法

【0016】(i i) GS-1302-3

性状: 無色油状

比旋光度: [α]_D²⁰=145.0° (c=0.101, クロロホルム)

分子量: 270

分子式: C₁₈H₂₂O₂

【0017】高分解能質量分析 (マトリクス: m-ニトロベンジルアルコール) m/z amu: 実測値 271.1677 [M+H]⁺, 計算値 (C₁₈H₂₂O₂ として) 271.1698

赤外部吸収スペクトル: (KBr法): ν_{cm⁻¹}: 3200, 2951, 1687, 1621, 1454, 1417, 1375, 1325.

紫外外部吸収スペクトル (メタノール中): λ_{max}: 293nm (log ε=4.21), 246nm (log ε=4.10), 203nm (log ε=4.32)

【0018】¹H-NMRスペクトル: (400MHz, CDCl₃ 溶液): δ ppm (積分、多重度、結合定数): 1.05(3H, d, 6.6), 1.09(1H, m), 1.13(3H, d, 6.8), 1.65(1H, m), 2.15(1H, m), 2.28(3H, s), 2.36(1H, m), 2.62(ddd, 3.4, 3.4, 14.7), 3.23(1H, m), 5.93(1H, d, 15.4), 6.43(1H, dd, 10.9, 15.4), 6.9*

第1表

被検菌名	最小生育阻止濃度 (μg/ml)	
	GS-1302-1	GS-1302-3
スタフィロコッカス・アウレウス (<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P)	>83.3	83
エンテロコッカス・フェシウム (<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 10541)	>83.3	83
バチルス・ズブチリス (<i>Bacillus subtilis</i> No.10707)	25	25

【0024】抗菌活性はバクトトリプトン (Difco 社製) 3g/L, 肉エキス 3g/L, 酵母エキス1g/L, グルコース 1g/L, 寒天16g/Lの組成から成る培地 (pH 7.0) を用いて寒天希釈法により測定した。

【0025】GS-1302類はペニシリウム (*Penici*

llium) 属に属し、GS-1302類生産能を有する微生物を培地に培養し、培養物中にGS-1302類を生成蓄積させ、該培養物からGS-1302類を採取することによって製造される。

【0026】GS-1302類生産微生物としてはペニ

*3(1H, d, 7.8), 6.96(1H, d, 7.8), 7.12(1H, d, 15.9), 7.57(1H, dd, 10.9, 15.4).

【0019】¹³C-NMRスペクトル: (100MHz, CDCl₃ 溶液): δ ppm (多重度): 21.16(q), 22.31(q), 24.34(q), 29.66(d), 30.97(d), 39.60(t), 41.66(t), 119.77(d), 127.65(d), 128.58(d), 131.05(d), 133.92(s), 135.14(s), 136.37(s), 140.80(s), 141.86(d), 147.30(d), 172.18(s), 114.1(s), 123.0(s), 136.0(s), 143.4(s), 148.2(s), 152.4(s), 157.8(s), 159.8(s), 164.6(s), 170.4(s).

【0020】溶解性: メタノール、アセトン、酢酸エチルおよびクロロホルムに易溶、水に難溶

呈色反応: ヨウ素、硫酸に陽性

薄層クロマトグラフィー: R_f 値 0.41

展開溶媒: クロロホルム-メタノール (20:1)

薄層: キーゼルゲル60F₂₅₄ (メルク社、Art. 5628)

展開方法: 室温、上昇法、15~60分

検出: 253.7nmの紫外線照射法

【0021】以上のデータよりGS-1302-1およびGS-1302-3は新規化合物であることが判明した。なお以上のデータは下記の機器により測定した。

融点: 柳本製作所 ミクロ融点測定装置

赤外部吸収スペクトル: 日本電子 RFX-30 FTIR分光光度計

紫外外部吸収スペクトル: 日立製作所 200-20型ダブルビーム分光光度計

NMRスペクトル: ブルッカー社 AM-400

【0022】化合物GS-1302類の生物活性は下記のとおりである。

各種細菌に対する抗菌作用

各種細菌に対する最小生育阻止濃度 (MIC) を第1表に示す。

【0023】

【表1】

シリウム属に属し、GS-1302類生産能を有する菌株であればいずれの菌株でも用いることができる。また、これらの菌株を人工的変異法、例えば紫外線照射、X線照射、変異誘起剤処理などによって変異させた変異株あるいは自然的に変異した変異株でもGS-1302類生産能を有するものであれば本発明に用いることができる。具体的に好適な例として、ペニシリウム・スピーシーズ (*Penicillium* sp.) G-1302株があげられる。

【0027】ペニシリウム・スピーシーズ (*Penicillium* sp.) G-1302株の菌学的性質は次のとおりである。

①肉眼的観察

麦芽エキス寒天培地を用いて、25℃で培養したとき、集落の直径は培養7日目で25～26mm、培養14日目で52～55mmに達する。培養7日目の集落は濃灰緑色で、周囲は淡青色から水色を呈し、その裏面は、クリーム色を呈する。

【0028】パレイショ・ブドウ糖寒天培地を用いて、25℃で培養したとき、集落の直径は培養7日目で約25mm、培養14日目で45～47mmに達する。培養7日目の集落は濃灰緑色で、周囲は淡青色から水色を呈し、その裏面はクリーム色を呈し、中央部は赤褐色を呈する。本菌株の生育温度は12～31℃であり、26℃前後で最も良好に生育する。生育し得るpHは3～10で、至適生育pHは6～7である。

【0029】②光学顕微鏡的観察

パレイショ・ブドウ糖寒天培地上で培養したときの本菌株の光学顕微鏡による観察結果は以下のとおりである。菌糸は隔壁を有し、無色、平滑でよく分岐する。分生子柄は束状になることはなく、菌糸から単生して立ち上がる。分生子柄は、平滑、無色で、長さ74～147μm、幅2～3μmである。分生子柄の先端に2～5本のメトレが形成され、そのメトレの先端に2～7個のフィアライドが形成される。メトレは円筒形で、長さ11～18μm、幅2～4μmを呈する。フィアライドはトックリ形を呈し、長さ7.5～12μm、幅は最も広い部位において2～3.5μmを呈する。分生子の個体発生様式は内生出芽型のフィアロ型であり、分生子はフィアライド先端より形成し、連鎖状となる。フィアロ型分生子は、単細胞、無色、楕円形あるいは垂球形で、長さ2～3.5μm、幅1.5～3μm、表面は平滑あるいはわずかに刺状を呈する。本菌株は、上述したアナモルフ(anamorph)のみ観察され、テレオモルフ(teleomorph)は観察されない。

【0030】以上の菌学的性質から、本菌の分類学上の位置を「ザ・ジェネラ・オブ・ファンジャイ・スポルディング・イン・ピュア・カルチャー 第2版(The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture, 2nd ed. Cramer, Vaduz, J. A. vonArx, 1974年)」に従

って検索した結果、本菌株は、ペニシリウム (*Penicillium*) 属に属すると同定された。

【0031】本菌株はペニシリウム・スピーシーズ G-1302 (*Penicillium* sp. G-1302)と命名され、ブダペスト条約に基づいて平成5年11月18日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-4470として寄託してある。

【0032】本発明のGS-1302類生産菌の培養に際してはペニシリウム属微生物の培養に用いられる通常の培養方法が適用される。用いられる培地は微生物の資化し得る炭素源、窒素源、無機物などを程よく含有する培地であれば天然培地、合成培地いずれでも使用できる。

【0033】炭素源としては、グルコース、フラクトース、シュクロース、スタビロース、澱粉、デキストリン、マンノース、マルトース、糖蜜などの炭水化物、クエン酸、リンゴ酸、酢酸、フマル酸などの有機酸、メタノール、エタノールなどのアルコール、メタン、エタン、プロパン、n-パラフィンなどの炭化水素、グルタミン酸などのアミノ酸あるいはグリセロールなどが用いられる。

【0034】窒素源としては塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、リン酸アンモニウムなどのアンモニウム塩、アスパラギン酸、グルタミン、シスチン、アラニンなどのアミノ酸、尿素、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、乾燥酵母、コーン・スチープ・リカー、大豆粉、綿実粕、大豆カゼイン、カザミノ酸、ファーマメディアなどが用いられる。

【0035】無機物としてはリン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸二水素ナトリウム、硫酸マグネシウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、硫酸コバルト、硫酸亜鉛、パントテン酸カルシウム、モリブデン酸アンモニウム、硫酸アルミニウムカリウム、炭酸バリウム、炭酸カルシウム、塩化コバルト、食塩などが用いられる。

【0036】その他必要に応じて培地にビタミン、例えばサイアミンなど菌体の増殖あるいはGS-1302類の生産を促進する物質を加えることができる。また微生物が特定の物質を要求する場合は、生育に必要なものを加えることが必要である。培養は振盪培養法、通気攪拌培養法などにより、20～40℃の温度で中性付近のpHで行われる。通常3～10日の培養によってGS-1302類の蓄積が最大に達し、培養は完了する。

【0037】培養物中に蓄積したGS-1302類を培養物から単離採取するに際しては、通常の生理活性物質を培養物から採取する方法が適用される。例えば、アセトン、メタノールなどの溶剤による菌体成分の抽出、ろ過、遠心分離などによる菌体除去、吸着樹脂、シリカゲル、シラナイズドシリカゲル、逆相シリカゲル、アルミニウム、セルロース、ケイ藻土、ケイ酸マグネシウム、

ゲルろ過剤、イオン交換樹脂などを用いるカラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィーによる活性物質の吸脱着処理もしくは適当な溶媒系による分配などによってGS-1302類は単離される。

【0038】上記精製工程中のGS-1302類の検出は、シリカゲル薄層クロマトグラフィーにより行うことができる。以下に実施例を示す。

【0039】

【実施例】

実施例1. 種菌として、ペニシリウム・スピーシーズG-1302株 (FERM BP-4470) を用い、第一種培地としてV8野菜ジュース (キャンベル社製) 20V/V%、デキストリン30g/L (pH6.5) を組成とする培地を用いた。種菌1白金耳を、50ml太型試験管に入れた第一種培地10mlに植菌し、25℃で5日間振盪培養した。

【0040】この第一種培養液10mlを300ml容量のエrlenマイヤーフラスコに入れた50mlの第二種培地に植菌した。第二種培地の組成は第一種培地の組成と同じである。第二種培養は25℃で2日間振盪培養により行った。得られた第二種培養液10mlを300ml容量のエrlenマイヤーフラスコに入れた主発酵培地50mlに植菌した。主発酵培地としては、V8野菜ジュース (キャンベル社製) 20V/V%、シュクロース30g/L、可溶性でんぷん20g/L、エビオス (アサヒビール社製) 5g/L、麦芽エキス (Difco社製) 10g/L、コーン・ステープ・リカー5g/L、炭酸カルシウム5g/L (pH7.0) を組成とする培地を用いた。この主発酵培養は25℃で5日間振盪培養することにより行った。

【0041】得られた主発酵培養液5リットルにケイ藻土250gを加えよく攪拌した後、ろ過し、ろ紙上に集めた菌体にメタノール4.5リットルを加えて、菌体成分を抽出した。このようにして得られた菌体メタノール抽出液3リットルに、脱イオン水1.3リットルを加えて希釈し、70%のメタノールを含む水で平衡化したダイヤ

イオンHP-20ssカラム (三菱化成工業社製) 150mlに通塔した。カラムを70%のメタノールを含む水600mlで洗浄した後、メタノール600mlで溶出し、メタノール溶出液を減圧下に濃縮後、150mlの酢酸エチルで抽出し、酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下に濃縮乾固して酢酸エチル抽出物

1.52gを得た。酢酸エチル抽出物をメタノールに溶解し、ケイ藻土5gを加えて攪拌し、このスラリーからメタノールを減圧下に留去し、酢酸エチル抽出物をケイ藻土に吸着させた。このケイ藻土を100%クロロホルムで充填したシリカゲルカラム (シリカゲル60メルク社製) 300mlの上端に加え、クロロホルム600ml、1%のメタノールを含むクロロホルム600ml、2%のメタノールを含むクロロホルム600ml、5%のメタノールを含むクロロホルム600mlおよび10%のメタノールを含むクロロホルム600mlで段階的に溶出した。GS-1302-1およびGS-1302-3は2%および5%のメタノールを含むクロロホルムにより溶出された。GS-1302-1およびGS-1302-3を含む溶出液を減圧下に濃縮乾固して粗精製物0.93gを得た。粗精製物を90%のアセトニトリルに溶解し、下記的高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分取条件により単離精製を行って、GS-1302-1を252mg、GS-1302-3を51mg得た。

【0042】HPLC分取条件

カラム; SH-363-10 (YMC-ODS-A 30φx250mm)

溶出液; 90%のアセトニトリルを含む水

流速; 20ml/min

検出; 220nmの紫外吸収

なお上記精製過程におけるGS-1302類の検出は、シリカゲル薄層クロマトグラフィー後、253.7nmの紫外線照射法により行った。

【0043】

【発明の効果】本発明によれば、抗菌作用を有する化合物GS-1302類を提供することができる。